

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-181816

(43)Date of publication of application : 26.06.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12Q 1/68
G01N 21/75
G01N 33/566
G01N 33/58

(21)Application number : 2000-374626

(71)Applicant : UNIV WASEDA
INST OF PHYSICAL & CHEMICAL
RES

(22)Date of filing : 08.12.2000

(72)Inventor : NOJIMA TAKAHIKO
MATSUMOTO KAZUKO
KONDO YASUMITSU
TASHIRO HIDEO
TAKENAKA SHIGEORI

(54) REAGENT AND METHOD FOR DETECTING DUPLEX NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new reagent for detecting a duplex nucleic acid and a method using this reagent for detecting the duplex nucleic acid formed by hybridization with a probe without labeling any target nucleic acid.

SOLUTION: One molecule of this duplex nucleic acid detecting reagent includes a naphthalenediimide group capable of being intercalated in the duplex nucleic acid and a β -diketone group capable of forming a lanthanoid metal complex.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-181816

(P2002-181816A)

(43) 公開日 平成14年6月26日 (2002. 6. 26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68	Z N A	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/75		G 0 1 N 21/75	Z 4 B 0 6 3
33/566		33/566	
33/58		33/58	A
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-374626(P2000-374626)

(22) 出願日 平成12年12月8日 (2000. 12. 8)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71) 出願人 390001421

学校法人早稲田大学

東京都新宿区戸塚町1丁目104番地

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 野島 高彦

東京都三鷹市大沢5-12-25

(72) 発明者 松本 和子

東京都世田谷区代沢3-9-12-105

(74) 代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二本鎖核酸の検出試薬と二本鎖核酸検出方法

(57) 【要約】

【課題】 二本鎖核酸を検出する新規試薬と、それを用いて、ターゲット核酸に対して一切のラベル化を施すことなくプローブとのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸を検出する方法を提供する。

【解決手段】 本発明の二本鎖核酸の検出試薬は、1分子中に、二本鎖核酸ヘインターカレート可能なナフタレンジイミド基と、ランタノイド金属錯体を形成可能なβ-ジケトン基を有することを特徴とする。

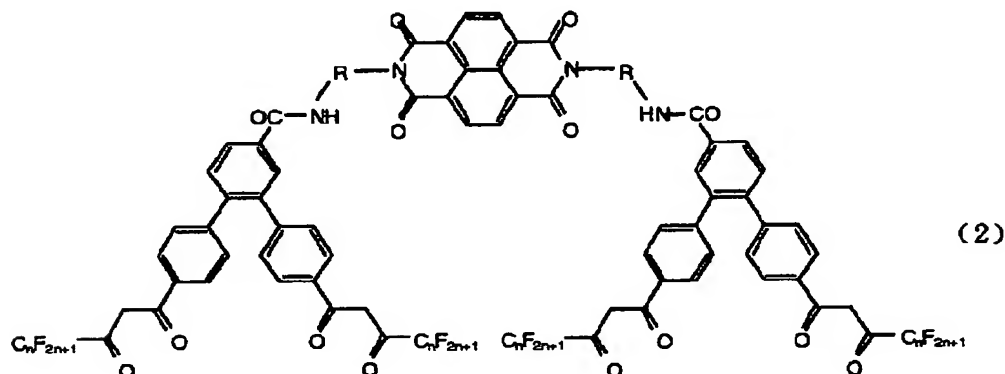
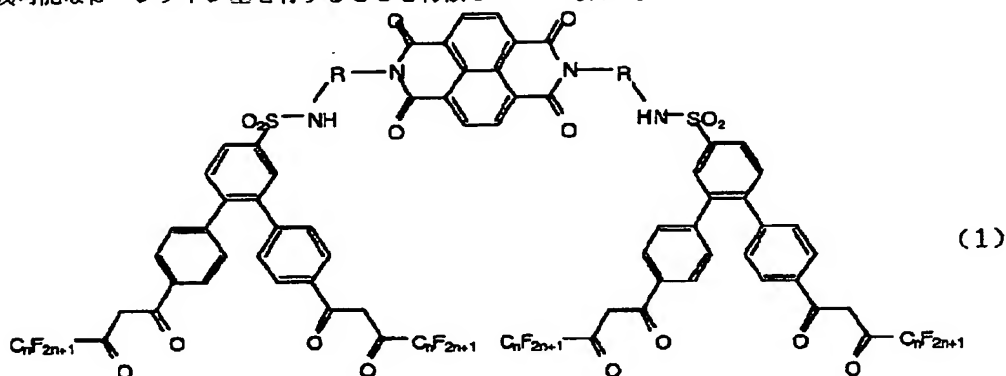
【特許請求の範囲】

【請求項1】 1分子中に、二本鎖核酸へインターカレート可能なナフタレンジイミド基と、ランタノイド金属錯体を形成可能なβ-ジケトン基を有することを特徴とする*

* する、二本鎖核酸の検出試薬。

【請求項2】 下式(1)又は(2)で表されることを特徴とする、請求項1に記載の二本鎖核酸の検出試薬。

【化1】



式中、Rは $-C_mH_{2m}N(R')C_nH_{2n}-$ で表されるリンカーであり、R'はアルキル基であり、mおよびnはそれぞれ1~10の整数である。

【請求項3】 前記β-ジケトン基にランタノイド金属が配位して蛍光性のランタノイド金属錯体を有することを特徴とする、請求項1又は2のいずれかに記載の二本鎖核酸の検出試薬。

【請求項4】 請求項3に記載の二本鎖核酸の検出試薬を二本鎖核酸にインターカレートさせ、前記ランタノイド金属錯体の蛍光を測定することを特徴とする二本鎖核酸検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は新規な二本鎖核酸の検出試薬とそれを用いる二本鎖核酸検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析実験においては以下のような実験手順が取られる。すなわち(1)プローブ核酸を基板上に固定化し、(2)2種の生体、例えば細胞周期の異なる段階にある細胞、あるいは正常人由来組織と患者組織から調製されたmRNA混合物、あるいはそれから逆転写によって調製され

たcDNA混合物をそれぞれ蛍光特性の異なる色素でラベルしたターゲット核酸とし、(3)該ターゲットをプローブに対し競合ハイブリダイゼーションさせた後に洗浄して残ったターゲットに結合している2種の色素の蛍光強度比を測定する。

【0003】ここで、プローブ核酸の固定化には現在大きく分類して2種の手法が存在する。すなわち、(1)リソグラフィック的手法を用いてプローブ核酸のモノマーを基板上で一残基ずつ重合して行く方法や、(2)生体由来の核酸試料、もしくはこれからPCRや逆転写によって調製された核酸をスポットして行く方法である。

【0004】またターゲット核酸のラベル化に関しても数種の手法が用いられている。例えば(1)生体由来のmRNA混合物に対してヌクレオチド交換反応を利用してラベル化ヌクレオチドを挿入する方法や、(2)生体由来のmRNA混合物に対してラベル化基質を用いて逆転写やPCRによってラベルされた核酸を増幅する方法などである。

【0005】しかしこの手法ではラベル化によって試料中の発現遺伝子存在比に影響が生じる可能性があり、その結果として、測定対象中に低存在比に含まれる試料に関して検出精度あるいは検出感度に影響が生じるという問題があった。そこで、ターゲット核酸に対して一切の

30

40

50

ラベル化を施すことなくプローブとのハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸を検出し、定量する手法の開発が強く要望されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ターゲット核酸に何らのラベル化をも必要としない、新規な二本鎖核酸の検出試薬とそれを用いる二本鎖核酸検出方法を提供する。

【0007】

【問題を解決するための手段】本発明者らは上で説明した従来技術に伴う問題を解決するべく鋭意研究し、

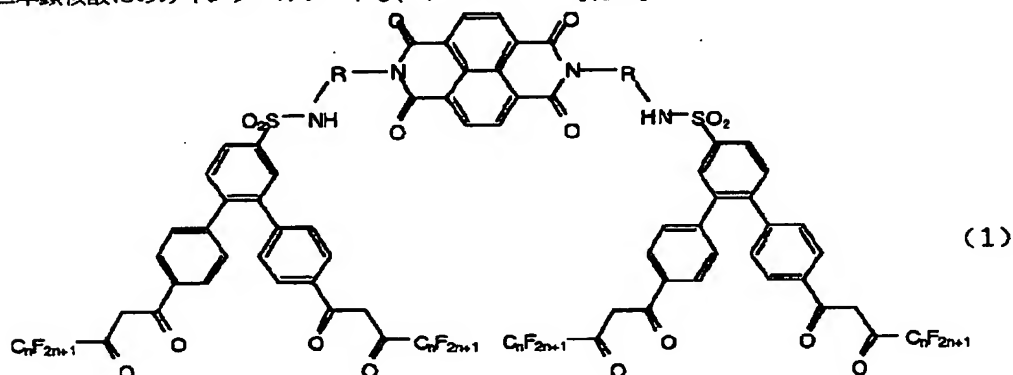
(1) ラベル化をすることなくターゲット核酸により形成された二本鎖核酸にのみインターカレートし、かつ *

* (2) 高精度、高感度で蛍光分析が可能な機能を併せ持つ検出試薬を見出すことに成功し本発明を完成するに至った。

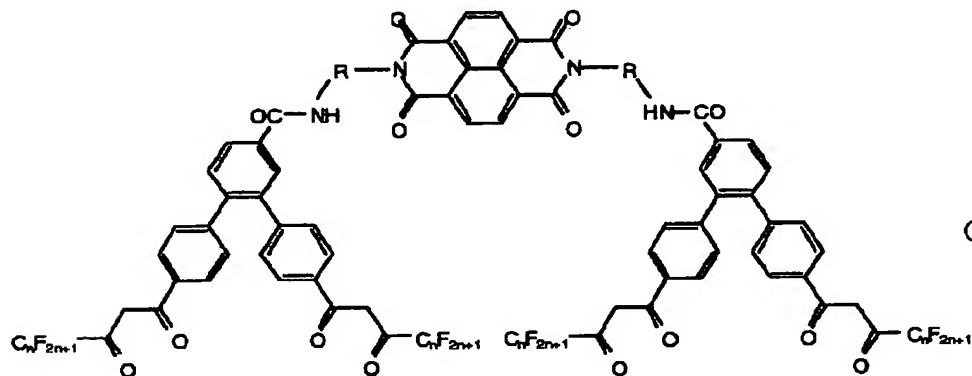
【0008】すなわち、本発明にかかる二本鎖核酸の検出試薬は、その分子中に、二本鎖核酸へインターカレート可能な基としてナフタレンジイミド骨格を有する基と、ランタノイド金属錯体を形成可能な特定構造を有するβ-ジケトン基とを有することを特徴とする。より具体的には、本発明にかかる二本鎖核酸の検出試薬は、下式(1)又は(2)で表される化学構造を有することを特徴とする。

【0009】

【化2】



(1)



(2)

式中、Rは $-C_mH_{2m}N(R')C_nH_{2n}-$ で表されるリンカーであり、R'はアルキル基であり、mおよびnはそれぞれ1~10の整数である。

【0010】さらに、本発明にかかる二本鎖核酸の検出試薬は、前記β-ジケトン基にランタノイド金属が配位することで蛍光性のランタノイド金属錯体を有するものを含む。

【0011】また、本発明にかかる二本鎖核酸の検出方法は、ターゲット核酸とプローブとで二本鎖核酸を形成させ、該二本鎖核酸に本発明にかかるランタノイド金属錯体を有する二本鎖核酸の検出試薬をインターカレートさせ、前記ランタノイド金属錯体の蛍光を測定することにより二本鎖核酸を検出し、または定量することを特徴

とするものである。また本発明には、この検出方法によるターゲット核酸の分子長や、分子数の定量方法、核酸の塩基配列決定法が含まれる。また、本発明には前記二本鎖核酸の検出試薬をさらに種々の他の有機化合物、核酸、酸素、抗原、抗体などの生体分子に結合させたものをも含み、これらを用いて核酸や蛋白質を検出する方法をも含むものである。

【0012】以下実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【0013】

【発明実施の形態】以下実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら

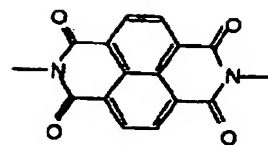
限定されるものではない。

【0014】本発明により検出される二本鎖核酸には特に制限はない。溶液中で形成された二本鎖核酸でも、固相上で形成された二本鎖核酸でもよい。通常特定の基板へプローブ核酸を固定し、ここに検出されるターゲット核酸を含む試料との間でハイブリダイゼーションさせて得る。また、固相で固定されるプローブ核酸には特に制限はないが、例えばターゲット核酸とハイブリダイゼーション可能な塩基配列を含む一本鎖のDNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）が挙げられる。さらに、ターゲット核酸としては、一本鎖DNA、RNAが挙げられる。それらの由来についてもなんら制限はない。

【0015】本発明にかかる検出試薬は、その分子中に二本鎖核酸にインターカレートする基を有することが特徴であり、かかる機能が知られている公知の基を選択することが可能である（本明細書中での説明で、インターカレータと記載する場合がある）。特に本発明においてはナフタレンジイミド骨格を有するものが好ましい。

【0016】

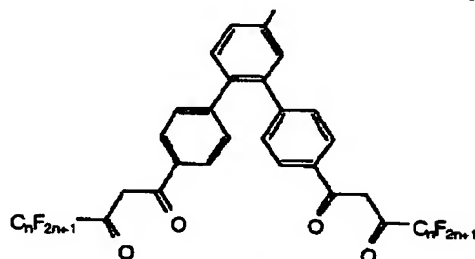
*【化3】



【0017】さらに本発明にかかる検出試薬はその分子中にランタノイド金属と錯体を形成する基を有することが特徴であり、かかる機能が知られている公知の基を選択することが可能である。特に本発明においてはβ-ジケトン骨格による錯体形成が好ましい。また、安定な錯体を形成させるべく本発明にかかる検出試薬のβ-ジケトンには1分子中に8個の酸素原子で配位可能な構造を有するものを選択することが好ましい。より具体的には下式で表される、フルオロアルキル基とビフェニル基を置換基とするβ-ジケトンが挙げられる（かかるβ-ジケトンをBHHC-Tとする）。

【0018】

*【化4】



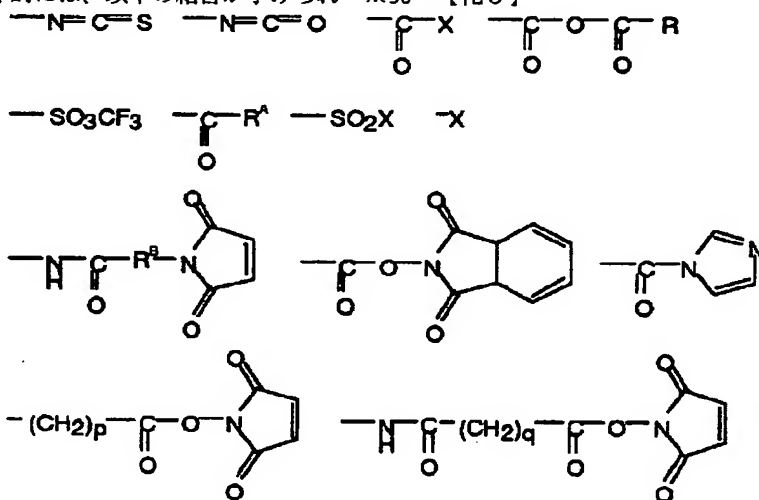
$n = 1 \sim 10$ の整数である。

【0019】さらに、これらの2種類の基を共有結合することが好ましく、種々の公知の共有結合反応を選択することができる。具体的には、以下の結合が挙げられ

※る。

【0020】

※30 【化5】



ただし、Xはハライド原子、 $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{C}_6\text{F}_5$ 、 $-\text{OSO}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_3$ から選択され、 R^a はアルキル基、アルケニル基、アリール基、アラルキル基から選択され、 R^b はア

ルキレン基、アリーレン基、アラルキレン基から選択され、 p は0~5、 q は2~10の整数である。

【0021】本発明で用いられるランタノイド金属イオンとしては、例えばユウロピウム (Eu)、サマリウム (S

m)、テルビウム (Tb)、ジスプロシウム (Dy) 等のイオンを挙げることができ、これらの蛍光特性により適宜選択する。

【0022】本発明にかかる検出試薬の合成方法には特に制限はなく、上で説明した機能を有する基を適当な種類、または長さの結合基で共有結合することで得られる。より具体的には次の4工程で行うことが好ましい。以下、それぞれの工程に分けて説明する。

【0023】第一工程

N,N-ビス(3-アミノプロピル)メチルアミンを1,4-ジオキサンに溶かし、これに S-tert-butylloxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidineを1,4-ジオキサンに溶かした溶液を室温で約2時間かけてゆっくり滴下し、約20時間攪拌する。白黄色の沈殿が生じるので、ろ過してこれを除去する。沈殿を1,4-ジオキサンで洗浄し、ろ液の1,4-ジオキサンとあわせて減圧留去すると黄色オイル状の物質が得られる。これをピーカーに移し、水を加えると白濁するので、これを濾過後、ここにNaClを加えて酢酸エチルで抽出した後、分取した有機相をK₂CO₃で乾燥する。これを濾過し、溶媒を減圧留去すると黄色オイル状の目的物を得る。

【0024】第二工程

第一工程で得られた化合物を、ナフタレン-1,4,5,8-テトラカルボン酸二無水物とともにTHF中90℃で12時間加熱する。室温まで冷却した後、エバポレーターでTHFを減圧留去する。クロロホルムを加えてオイル状物質を溶かし、不溶成分を濾過する。濾液を減圧留去すると茶色のオイル状物質が得られるので、メタノールに溶かし水に加えて再沈殿させる。吸引ろ過後、真空乾燥によって茶褐色の目的物を得る。

【0025】第三工程

第二工程で得られた化合物にTFAを加えて室温で3h攪拌する。TFAを減圧留去すると、赤褐色の油状物質が得られる。これをメタノールに溶かし、クロロホルムを加

えて再沈殿を行う。析出する沈殿を吸引ろ過して、減圧乾燥すると桃色の粉末状の化合物が得られる。

【0026】第四工程

第三工程で得られた化合物をクロロホルムに溶解し、BHCT、トリエチルアミンとともに室温で5h攪拌する。反応終了後、溶媒を減圧留去し、茶色のオイル状物質を得る。これに純水を加えて激しく攪拌すると肌色の固体が析出してくるのでこれを濾過し、次いでエーテルで洗浄することにより目的物を得る。

【0027】また、本発明にかかる検出方法は、本発明にかかる検出試薬を用いることを特徴とし、かつ検出に蛍光分析を利用することである。

【0028】本発明にかかる検出方法は具体的には以下のような工程から成ることが好ましい。(1)プローブ核酸を固体表面上に固定しておき、ここにターゲット核酸を与えハイブリダイゼーション形成させる、(2)インターカレータを与える、(3)これを洗浄することにより二本鎖にインターカレートしたインターカレータを残し、インターカレートしなかったものや、非特異的にプローブやターゲット核酸に吸着していたものを除去する。(4)残ったインターカレータにランタノイドイオンを与えて錯形成させる、(5)時間分解蛍光測定を行い、二本鎖核酸の定量を行う。

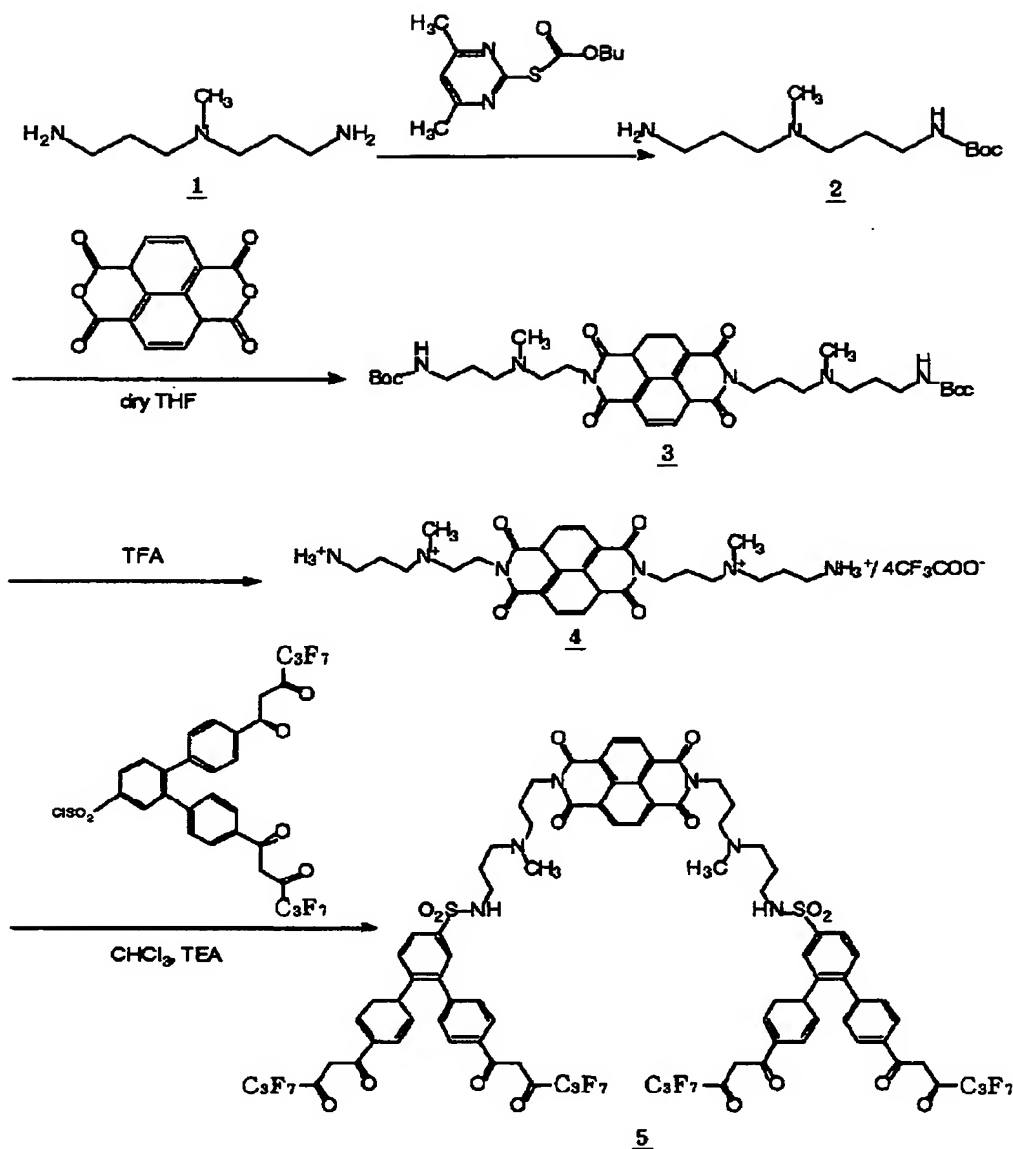
【0029】ここで、プローブを固定化する固体表面材質は通常公知の種々の材料が選択される。具体的にはガラス、プラスチック、金属などが挙げられる。また固体表面を持つ担体は平板に限らず、ビーズ、ファイバーその他の形状でも可能である。以下本発明を実施の形態に即して説明する。

30 【0030】

【実施例】インターカレータの合成例をスキーム1に示した。

【化6】

スキーム 1



【0031】N,N-ビス(3-アミノプロピル)メチルアミン 16.1ml(0.1mol)を1,4-ジオキサン45mlに溶かし、これにS-tert-butyloxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine 12g(0.05mol)を1,4-ジオキサン50mlに溶かした溶液を室温で約2時間かけてゆっくり滴下し、約20時間攪拌した。白黄色の沈殿が生じたのでろ過してこれを除去した。沈殿を1,4-ジオキサンで洗浄し、ろ液の1,4-ジオキサンとあわせて減圧留去すると黄色オイル状の物質が得られた。これをビーカーに移し、水75mlを加えると白濁した。ろ過後、約20gのNaClを加えて酢酸エチルで抽出(50ml×4回)した後、分取した有機相を K_2CO_3 で乾燥した。こ

れをろ過し、溶媒を減圧留去すると黄色オイル状の目的物を得た。収量：8.0g、収率：66%、性状：黄色オイル状。

【0032】ナフタレン-1,4,5,8-テトラカルボン酸二無水物 1.67g(6.23mmol)、THF25ml、化合物2 7.76g(31.6mmol)を加え90℃で12時間加熱を行った。室温まで冷却した後、エバポレーターでTHFを減圧留去した。クロロホルムを加えてオイル状物質を溶かし、不溶成分を濾過した。濾液を減圧留去すると茶色のオイル状物質が得られたので、メタノール20mlに溶かし水200mlに加えて再沈殿を行った。吸引ろ過後、真空乾燥によって茶褐色の目的物を得た。収量：

11

3.82 g、収率：85%、性状：茶色粉末状、融点：113-117℃。

【0033】化合物3 1.00 g (1.38mmol)にTFA 5.35 mlを加えて室温で3 h攪拌した。TFAを減圧留去すると、赤褐色の油状物質が得られた。これをメタノール約15 mlに溶かし、クロロホルム約200 mlを加えて再沈殿を行った。析出した沈殿を吸引ろ過して、減圧乾燥すると桃色の粉末状の化合物が得られた。収量：1.28 g、収率：95%、性状：淡桃色粉末状。

【0034】クロロホルム 5 mlに化合物4 0.34 g (0.35mmol)、BHHCT 0.63 g (0.78mmol)、トリエチル *

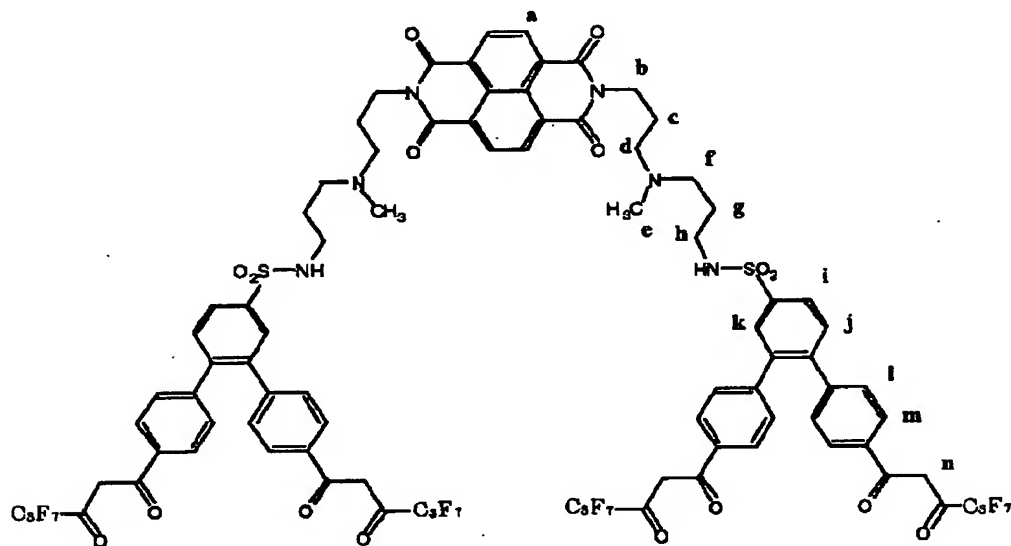
12

*アミン 0.5 ml (3.5mmol)を加え室温で5 h攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、茶色のオイル状物質を得た。これに純水を加えて激しく攪拌すると肌色の固体が析出してきたのでこれを濾過し、次いでエーテルで洗浄した。収量：0.6 g、収率：83%、性状：肌色粉末、融点：>300℃、TOF-MASS：2064.27にピークが見られた。(計算値2059.61)。NMRスペクトルの吸収パターンを表1に示す。

【0035】

【表1】

表 1



δ (ppm)	帰属	分裂	積分比
8.70a	s	3.9/4H	
8.05m	d	5.0/8H	
8.00	i	d	4.3/2H
7.88	k	s	3.1/2H
7.80	j	d	2.8/2H
7.38	l	d	6.5/8H
6.99	n	s	2.5/8H
4.14	b	br	3.4/4H
3.17	d, f	br	11.1/8H
2.91	h	br	3.9/4H
2.76	e	s	7.3/6H
2.09	c	br	4.1/4H
1.86	g	br	3.1/4H

【0036】アッセイプレートを用いたハイブリダイゼーション形成実験

5'-ビオチン化および3'-FITC化された合成オリゴデオキシリボヌクレオチド(23-24mer; 配列表の配列番号

1および2)を、SSPE緩衝液(100mM phosphatepH 7.4, 149mM NaCl, 1 mM EDTA)に溶解し、これをアビジンコートされたアッセイプレート(Delfia Streptavidin Microtiter Strips, C122-105)に種々の濃度で与

え、室温で10min 放置した。このプレートをSSPE 緩衝液で洗浄後、プレートに残ったDNA分子数を FITC 蛍光測定により定量した (Wallac ARVOSX 1420 Multilabel Counter)。その結果、各ウェルに最大 1.8 pmolのDNA分子が吸着することがわかった。

【0037】5'-ビオチンラベルされた DNA (配列表の配列番号3) をアッセイプレートに与え、室温で10min放置後、SSPE緩衝液で洗浄した。ここに、このDNAと相補的塩基配列を持ち、5'-FITC (FITC:フルオレセインイソチオシアネート) ラベルされた DNA (配列表の配列番号4) を 100 pmol与え、SSPE 緩衝液中、85℃で10min加熱後、45℃で一晩保温した。このプレートを室温に戻した後、洗浄し、FITC 蛍光測定を行った。同時に、プレート上のDNAとは相補性を持たないDNA (配列表の配列番号1) を用いても同様の実験を行った。その結果、塩基対を生成している場合にのみFITCの有意な蛍光が観察された。ハイブリダイゼーションしていない過剰DNA は、洗浄3回で十分に洗い流された。

【0038】5'-ビオチンラベルされたプローブ DNA (24mer) をアッセイプレートに与え、SSC緩衝液中、室温で10min放置後、洗浄した。ここに、このDNAと相補的塩基配列を持ち、5'-FITCラベルされたターゲット DNA (24mer) を100 pmol与え、SSC緩衝液中85℃で10min加熱後、45℃で一晩保温した。このプレートを室温に戻した後、SSC緩衝液で洗浄し、FITC蛍光測定によりハイブリダイゼーションが十分に行われていることを確認した。ここにインターカレーター-Eu錯体 (BHQ12: Eu = 1:2) 100 pmolを与え、SSC中で室温で2時間放置した後、SSC緩衝液で2回洗浄した。時間分解蛍光測定により、プレートに残ったEu錯体を定量した。同様の実験を、(ii) プローブDNAを加えない場合、及び (iii)*

* プローブDNAとターゲットDNAとが相補的配列でない場合についてについても行った。その結果、ハイブリダイゼーション形成する場合にのみ有意な蛍光強度が観測された。

【0039】5'-ビオチン化プライマー及び3'-FITC化プライマーを用いて調製した149mer (配列表の配列番号5) とその相補的DNAからなる二本鎖DNAをアビジンコートされたアッセイプレートに与え、SSC緩衝液中、室温で2時間放置して吸着させた後、洗浄した。ここに、一定量の錯体を与え、室温で2時間放置した後、SSC緩衝液で洗浄した。インターカレートしている錯体分子数はEuの時間分解蛍光測定により定量した。その結果、Euの蛍光強度と、固定されたDNA分子数とがほぼ比例することがわかった。このことから、プレート上に存在する種々の分子数のDNAに対して錯体が結合する際、一定範囲内の塩基対: 錯体数を保つことが示された。

【0040】

【発明の効果】本発明にかかる二本鎖核酸の検出試薬は、その分子中に、二本鎖核酸ヘインターカレート可能な基としてナフタレンジイミド骨格を有する基と、ランタノイド金属錯体を形成可能な特定構造を有するβ-ジケトン基とを有することを特徴とする。従って、本発明にかかる二本鎖核酸の検出方法では、ターゲット核酸等の実験対象に一切の修飾(ラベル化)を施さないため、試料中に含まれる様々な存在比の核酸試料を定量することができる。特にこれまでの競合ハイブリダイゼーションでは原理的に不可能であった、核酸分子数の定量、あるいは核酸分子長の定量が可能になるため、遺伝子発現解析の定量性をこれまで以上に高めることができる。

【0041】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Waseda University

<110> Rikagaku Kenkyusho

<120> Reagent for detecting of a double stranded nucleic acid and the method for detecting of a double stranded nucleic acid

<160> 5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 1

cqccaqqgtt ttccaqtc cga 23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 2

agcggataac aatttcacac agga 24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 3

agcggataac aatttcacac agga 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 4

tcctgtgtga aattgttatc cgct 24

<210> 5

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 5

cqccaqqgtt ttcccaqtca cgaqgttga aaacgacggc cagtgaattc gaqctcggta 60

cccqggggtc ctctaagatc qacctgcaag catqcaagct tggcgtaatc atqgtcataq 120

ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgct 149

【図面の簡単な説明】

【図1】アビジンコートされたプレートへのビオチンラベルDNAの結合量を示す。

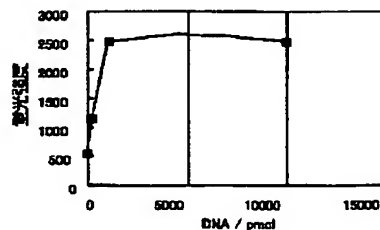
【図2】アッセイプレート上に固定化されたビオチンラベルDNAへの相補的DNAハイブリダイゼーションを示す蛍光強度測定データである。

* 【図3】ユウロピウム蛍光によるハイブリダイゼーションの測定結果を示す。

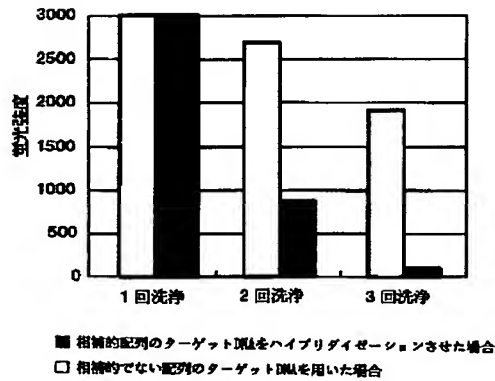
【図4】プレートに固定された二本鎖DNAの分子数と、インターカレートした錯体の蛍光強度の関係を示す。

*

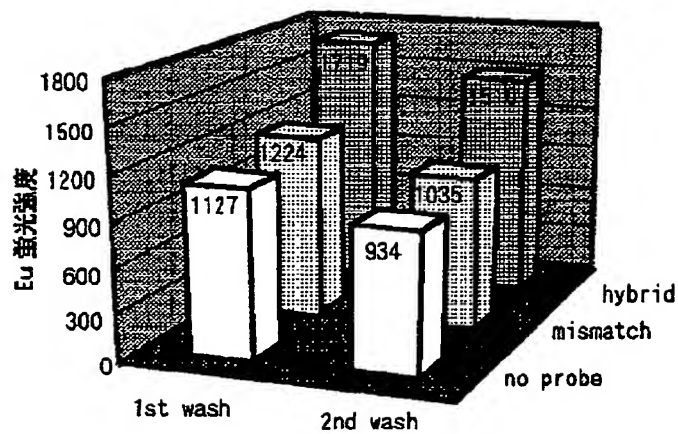
【図1】



【図2】

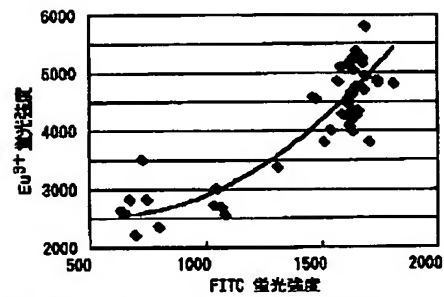


【図3】



アビジンコートされたプレートに、ビオチン化されたプローブDNAを結合させ、ここにプローブDNAと相補的配列を持つターゲットDNAを与えて室温で1時間放置した。その後、1×SSCによる洗浄を1回および2回行った。あらかじめプレート上にプローブDNAを与えておかなかった場合 (no probe) およびプローブDNAとターゲットDNAとが相補的でない場合 (mismatch) についても同時に実験を行った。

【図4】



DNA分子はビオチンもしくはFITCラベルされた2種類のプライマーを用いてPCRにより増幅した。順長148塩基対。アビジンコートされたプレートにこのDNAを固定し、十分洗浄した後、インターカレータのユウロピウム錯体を加え、2回洗浄した。洗浄後のFITC及びユウロピウム蛍光強度を測定した。

フロントページの続き

(72)発明者 近藤 恭光
埼玉県新座市栄2-1-6 グッドライト
タウンA102
(72)発明者 田代 英夫
東京都文京区西片1-7-21
(72)発明者 竹中 繁織
福岡県古賀市舞の里4-23-21

F ターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FA11 FB07 FB12
GC15
2G054 AB07 CA22 CE02 EA03 GA04
GB02
4B063 QA01 QQ42 QR55 QR66 QS34
QS36 QX02

THIS PAGE BLANK (USPTO)